EXTRAIT DES

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

(Mars 1967, Tome 112.)

# LE CYCLE TRICARBOXYLIQUE CHEZ *AEROBACTER AEROGENES*

PAR

**P. FORGET** et **F. PICHINOTY**

MASSON ET C^IE^, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* »
(N° d'ordre 4301. — Extrait Mars 1967. — Tome **112**, pp. 261-290.)

# LE CYCLE TRICARBOXYLIQUE CHEZ *AEROBACTER AEROGENES* (*)

par P. FORGET et F. PICHINOTY

(*Laboratoire de Chimie Bactérienne, Centre National de la Recherche Scientifique, Marseille*)

## INTRODUCTION

En 1956, Gilvarg et Davis [**9**] montrèrent que la perte par mutation de l'enzyme de condensation rendait *Escherichia coli* et *Aerobacter aerogenes* inaptes à oxyder l'acétate en aérobiose, apportant ainsi la preuve que, chez les deux organismes, le catabolisme de cet acide organique est l'œuvre du cycle de Krebs. Nous décrirons quelques expériences qui fournissent des arguments nouveaux favorables aux conclusions de ces auteurs. Trois techniques classiques ont été employées : la méthode de l'induction séquentielle, l'action d'un inhibiteur spécifique et la recherche des enzymes dans les extraits. Nous nous sommes aussi intéressés à quelques aspects importants de la régulation de la biosynthèse des enzymes du cycle tricarboxylique. Une bactérie dénitrifiante, telle que *Micrococcus denitrificans,* se développe en anaérobiose dans un milieu où le nitrate est l'oxydant, et le succinate ou l'acétate la seule source d'énergie [**8**, **30**]. En revanche, *A. aerogenes,* qui, comme ce dernier organisme, possède le

(*) Manuscrit reçu le 27 octobre 1966.

cycle tricarboxylique et la nitrate-réductase respiratoire [31], ne peut croître dans de telles conditions. L'observation précédente nous a incidemment conduits à rechercher quel pouvait être le rôle joué par le cycle au cours de la respiration anaérobie de $NO_3^-$.

Une partie des résultats figurant dans le présent mémoire a déjà été exposée dans un bref compte rendu [30].

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche. — Nous avons toujours employé la souche L III-I d'*A. aerogenes*.

Conditions de croissance. — Les cultures sont effectuées à 32° dans le milieu de base suivant : $Na_2HPO_4 . 12\,H_2O$, 3,575 g ; $KH_2PO_4$, 0,98 g ; $MgSO_4 . 7\,H_2O$, 0,03 g ; $NH_4Cl$, 0,5 g ; $FeSO_4$ et $CaCl_2$, traces ; eau, 1 000 ml ; pH = 7. L'aliment carboné est employé généralement à la concentration de 1 ou 2 g au litre, stérilisé à part et ajouté dans le milieu au moment de l'ensemencement. Lorsqu'il sert d'accepteur d'hydrogène dans les cultures anaérobies sur glucose, l'acide fumarique est utilisé à la concentration de 2 g/l. On le neutralise toujours par NaOH. Dans les cultures fermentant le mélange pyruvate + fumarate, on met 2 g de pyruvate de sodium (stérilisé par filtration) et 5 g d'acide fumarique par litre. Dans les cultures anaérobies fermentant le citrate, on met 5 g de citrate de sodium par litre. $KNO_3$ est employé à la concentration de 5 g au litre. Les cultures anaérobies sont généralement faites dans des ballons sous vide. Les cultures aérobies sont faites dans des fioles à toxine agitées. Excepté dans les cas où on les recueille en phase exponentielle, les bactéries sont récoltées par centrifugation après 20 à 24 heures d'incubation. Ensuite, elles sont lavées deux fois par centrifugation et remises en suspension homogène.

Estimation de la densité bactérienne. — La densité des cultures et des suspensions cellulaires est estimée par mesure de la densité optique, à 450 mμ, dans des cuves ayant un passage lumineux de 10 mm, avec un spectrophotomètre Jean et Constant dont la tare est réglée à la valeur 60. Pour obtenir le nombre de μg ou de mg (poids sec) par ml, on se sert d'une courbe de calibration représentant les variations de la densité optique en fonction de la masse bactérienne.

Extraits enzymatiques. — Ils sont obtenus par traitement sonique (10 min.) des suspensions dans un appareil Raytheon, et séparés des débris cellulaires par centrifugation à 5° (20 000 *g* ; 20 min.).

Mesure des activités enzymatiques. — Nous nous sommes servis de méthodes très classiques qu'il est inutile de décrire ici. Pour chacune des enzymes, nous donnons : la référence de la publication où la technique se trouve exposée, la nature du tampon, le pH, la température à laquelle les mesures sont effectuées, et quelques autres renseignements complémentaires.

1° *Enzyme de condensation* [24]. Tampon phosphates pH = 7,4 ; 37° ; on opère en présence d'acétyl-phosphate comme donneur de groupements acétyle, d'un extrait brut préparé à partir d'une culture anaérobie sur milieu complexe de la souche ML 30 d'*E. coli* servant à la fois de source de phospho-transacétylase et de CoA ; l'activité acétyl-phosphatase est estimée dans un témoin sans oxalacétate, puis déduite de la valeur trouvée dans l'essai réel.

2° *Aconitase* [1]. Tampon phosphates pH = 7 ; 25° ; substrat, isocitrate (ou dans quelques cas, citrate).

3° *Isocitrate-déshydrogénase* [10]. Tampon tris pH = 7 ; 25° ; substrat, isocitrate ; activateur, $Mn^{++}$ ; accepteur, TPN.

4° *α-cétoglutarate-déshydrogénase* [14]. Tampon phosphates pH = 6 ; 37° ; cocarboxylase ; accepteur, ferricyanure ; mesure de la vitesse de dégagement du $CO_2$ par la technique de Warburg.

5° *Succinate-déshydrogénase* [2]. Tampon phosphates pH = 7,6 ; 37° ; KCN ; transporteur d'électrons, phénazine-méthosulfate ; accepteur final d'électrons, $O_2$. Les calculs sont effectués en se basant sur le fait que l'oxydation par $O_2$ de la leucophénazine-méthosulfate produit $H_2O_2$ [35].

6° *Fumarase* [21]. Tampon phosphates pH = 7 ; 25° ; substrat, fumarate.

7° *L-malate-déshydrogénase* [11]. Tampon glycine-NaOH pH = 10 ; 25° ; substrat, L-malate.

8° *Acétokinase* [34]. Tampon tris pH = 7,4 ; 37° ; substrat, acétate ; ATP ; $Mg^{++}$ ; $NH_2OH$.

9° *Phospho-transacétylase* [36]. Tampon tris pH = 8 ; 37° ; substrat, acétyl-phosphate ; CoA ; arséniate de potassium ; KCl.

10° *Isocitratase* [16]. Tampon tris pH = 7,4 ; 37° ; substrat, isocitrate ; $Mg^{++}$ ; EDTA.

La malate-synthétase a été recherchée selon la technique de Dixon et Kornberg [5].

Quelle que soit l'enzyme, les activités spécifiques des extraits sont toujours exprimées en μmoles du substrat par heure et par mg d'azote.

Activité respiratoire. — Elle est mesurée à l'aide de la technique manométrique de Warburg. Les conditions sont les suivantes : tampon phosphates pH = 7, 330 μmoles ; bactéries, 2 à 5 mg (poids sec) ; chloramphénicol, 150 μg ; substrat carboné, 10 μmoles (diverticule) ; volume total, 3 ml ; KOH à 10 p. 100, 0,1 ml (puits central) ; phase gazeuse, air ; température, 37°. Un témoin sans substrat carboné permet de mesurer la respiration endogène des cellules ; celle-ci est déduite de l'activité de chaque système. L'addition de chloramphénicol a pour but d'empêcher, en cours d'expérience, les processus d'adaptation mettant en jeu une biosynthèse protéique.

Techniques analytiques. — On dose avec des méthodes colorimétriques le citrate [38], le glucose [25] et le nitrite [33]. La teneur en azote des extraits est estimée par micro-Kjeldahl.

## RÉSULTATS

### I. — Existence du cycle tricarboxylique.

1° Substrats carbonés permettant la croissance. — La souche utilisée se développe, en aérobiose, aux dépens des aliments carbonés suivants : glucose, pyruvate, acétate, succinate, malate, fumarate, α-cétoglutarate et citrate. Elle fait fermenter le glucose, le citrate et le mélange pyruvate + fumarate. En anaérobiose et en présence de $NO_3^-$, elle ne pousse pas aux dépens du succinate ou de l'acétate.

2° Substrats respiratoires utilisés. — *A. aerogenes* L III-1 possède la nitrate-réductase respiratoire [**31**] et la fumarate-réductase [**29**]. Grâce à ces enzymes, elle peut, en anaérobiose, utiliser le nitrate et le fumarate comme accepteurs d'hydrogène. Par réduction, $NO_3^-$ est converti en $NO_2^-$, et le fumarate donne du succinate. Les tétrathionate-et thiosulfate-réductases sont absentes. Contrairement à ce qui se produit chez *M. denitrificans,* le nitrite n'est pas réduit en $N_2$.

3° Critère de l'induction séquentielle. — Pour appliquer au cas présent la méthode de l'induction séquentielle [**37**], il fallait déterminer si les bactéries adaptées à l'un des intermédiaires du cycle le sont aussi à l'égard de plusieurs autres.

On utilise des suspensions cellulaires lavées provenant de cultures aérobies faites sur des milieux contenant des substrats carbonés différents : glucose, pyruvate, acétate, succinate ou citrate. Leur activité respiratoire envers $O_2$ est mesurée en présence de plusieurs donateurs d'hydrogène : glucose, pyruvate, acétate, succinate, fumarate, malate et citrate. Les résultats sont consignés sur le tableau I. Dans tous les cas, la respiration due aux métabolites endogènes est déduite. On peut faire les constatations suivantes : 1° Les cellules provenant de cultures stationnaires sur pyruvate, acétate, succinate ou citrate oxydent avec des vitesses élevées le glucose, le pyruvate, l'acétate, le succinate, le fumurate et le malate. 2° Dans le cas des cultures sur glucose, les bactéries oxydent rapidement l'acétate, le fumarate et le malate seulement lorsqu'elles sont récoltées en phase stationnaire ; si le prélèvement est effectué pendant la phase exponentielle les activités à l'égard de ces quatre acides sont fortement réduites. 3° Enfin, quel que soit l'aliment carboné présent dans la culture, les cellules récoltées en phase stationnaire ne métabolisent pas le citrate avec une vitesse appréciable. Les résultats ci-dessus suggèrent que le cycle opère lorsque *A. aerogenes* se développe en aérobiose sur acétate, pyruvate, succinate ou citrate. Dans le cas du glucose, tout se passe comme si son fonctionnement se trouvait fortement réduit durant la phase exponentielle et prenait ensuite une

ampleur beaucoup plus grande durant la phase stationnaire. On se trouve là en présence d'un phénomène de régulation dont l'origine sera précisée au second chapitre. L'absence d'activité envers le citrate de cellules ayant crû sur ce composé constitue un fait assez remarquable sur lequel nous aurons l'occasion de revenir.

Nous avons jugé utile de faire des expériences semblables aux précédentes avec des suspensions issues de cultures anaérobies. Le système respiratoire d'*A. aerogenes* étant constitutif, ces suspensions

TABLEAU I. — **Influence de la nature de l'aliment carboné utilisé pendant la croissance de cultures aérobies, sur l'activité respiratoire à l'égard de $O_2$ des cellules mesurée en présence de différents substrats.**

| SUBSTRATS | ALIMENT CARBONÉ PRÉSENT DANS LA CULTURE | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Glucose | | Pyruvate | Acétate | Citrate | Succinate |
| | S | E | S | S | S | S |
| Glucose ..... | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Pyruvate ..... | 87 | 46 | 102 | 145 | 60 | 98 |
| Acétate ..... | 100 | 22 | 98 | 137 | 85 | 66 |
| Succinate ..... | 77 | 9 | 115 | 132 | 87 | 126 |
| Fumarate..... | 66 | 9 | 90 | 110 | 66 | 108 |
| Malate ..... | 87 | 17 | 118 | 118 | 71 | 84 |
| Citrate ..... | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 |

On attribue arbitrairement la valeur 100 à l'activité respiratoire obtenue en présence de glucose. E = cellules récoltées pendant la phase exponentielle. S = cellules récoltées durant la phase stationnaire vingt-quatre heures environ après le moment de l'ensemencement.

conservent l'aptitude à consommer $O_2$. Examinons les résultats rassemblés sur le tableau II. Ici encore, la respiration endogène est déduite. Nous voyons ceci : 1° Les cellules provenant de cultures ayant fait fermenter le citrate ou le mélange pyruvate + fumarate oxydent avec une vitesse élevée l'acétate, le succinate, le fumarate et le malate. 2° Les bactéries qui se sont développées en présence de nitrate n'oxydent absolument pas l'acétate ni le succinate. 3° De même, les bactéries qui ont fait fermenter le glucose en l'absence de $NO_3^-$ sont pratiquement dépourvues d'activité envers l'acétate et les différents intermédiaires du cycle. 4° On n'observe jamais la moindre activité avec le citrate. Nous sommes ainsi en mesure de prévoir que les enzymes du cycle doivent être présentes à des niveaux relativement élevés lorsque *A. aerogenes* fermente le citrate ou le mélange pyruvate + fumarate. Une telle supposition, il est à peine

besoin de le rappeler, n'implique pas nécessairement que, dans ces conditions, le cycle fonctionne comme voie oxydative et produise de l'énergie. Enfin, les faits rapportés laissent entrevoir l'éventualité selon laquelle une combustion complète du glucose ou du pyruvate serait impossible lorsque l'organisme respire $NO_3^-$.

Il est difficile d'expliquer l'inactivité des cellules à l'égard du citrate. Cependant, l'expérience suivante fournit quelques rensei-

TABLEAU II. — **Influence de la nature de l'aliment carboné utilisé pendant la croissance et de l'accepteur d'hydrogène ajouté aux cultures anaérobies, sur l'activité respiratoire à l'égard de $O_2$ des cellules mesurée en présence de différents substrats.**

| SUBSTRATS | ALIMENT CARBONÉ PRÉSENT DANS LA CULTURE | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Glucose | | Pyruvate | | Citrate |
| | ACCEPTEUR D'HYDROGÈNE PRÉSENT DANS LA CULTURE | | | | |
| | | Nitrate | Fumarate | Nitrate | |
| Glucose ..... | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Pyruvate ..... | 80 | 6 | 100 | 100 | |
| Acétate ..... | 1 | 0 | 40 | 0 | 25 |
| Succinate ..... | 1 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| Fumarate ..... | 11 | 4 | 80 | 22 | 40 |
| Malate ..... | 8 | 14 | 72 | 33 | 80 |
| Citrate..... | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

On attribue arbitrairement la valeur 100 à l'activité respiratoire obtenue avec le glucose. Dans tous les cas, les cellules ont été récoltées durant la phase stationnaire vingt-quatre heures environ après le moment de l'ensemencement.

gnements intéressants. On laisse croître, à 32°, une culture aérobie contenant du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Quatre prélèvements sont effectués en des temps différents. Les cellules sont centrifugées, lavées, puis remises en suspension. Leur activité respiratoire envers $O_2$ est mesurée dans deux systèmes différents, l'un contenant du glucose, l'autre du citrate (tableau III). Lorsqu'elles sont prélevées pendant la phase exponentielle, les bactéries oxydent le citrate avec une vitesse élevée. Mais celle-ci diminue rapidement à partir du moment où la culture entre en phase stationnaire, puis devient nulle douze heures après l'arrêt de la croissance. Deux explications viennent immédiatement à l'esprit : durant la phase stationnaire, une (ou plusieurs) enzyme(s) du cycle ou un système de transport actif (perméase) s'inactive(nt). La première de ces hypothèses peut pratiquement déjà être écartée

car les cellules issues de cultures aérobies sur pyruvate, acétate, citrate ou succinate, qui n'oxydent pas le citrate, sont très actives à l'égard de l'acétate et de certains membres du cycle. Nous retiendrons donc la seconde, mais il convient de remarquer que, jusqu'à présent, l'existence d'une citrate-perméase ne semble pas avoir été établie avec certitude.

Tableau III. — **Variations de la vitesse d'oxydation aérobie du citrate en fonction de l'âge des cellules.**

| Conditions de récolte | Activité |
|---|---|
| Phase exponentielle | 85 |
| Phase stationnaire depuis 1 h | 52 |
| Phase stationnaire depuis 3 h | 40 |
| Phase stationnaire depuis 12 h | 2 |

Les activités sont exprimées par rapport à celle qui est obtenue en présence de glucose. On attribue à cette dernière la valeur 100.

4° Action inhibitrice du fluoracétate. — Sous l'action de l'enzyme de condensation, le fluoracétate (FA) peut se combiner, *in vivo*, avec l'oxalacétate pour produire du fluorocitrate qui inhibe compétitivement l'aconitase, donnant ainsi lieu à une synthèse létale qui bloque de manière sélective le fonctionnement du cycle de Krebs [**23**, **27**, **28**].

Nous avons étudié l'action du FA sur la respiration de $O_2$ par des suspensions cellulaires (cultures aérobies sur glucose) lavées et placées en présence de l'un des donneurs d'hydrogène suivants : glucose, acétate, succinate et fumarate. En fin d'expérience, le citrate qui s'est accumulé dans les coupes de Warburg est dosé. De nombreuses expériences ont été faites mais nous n'en décrirons qu'une seule. L'examen des courbes représentées sur la figure 1 conduit aux constatations suivantes : 1° La vitesse de consommation de $O_2$ mesurée en présence de glucose (courbes 1 et 2) n'est pas diminuée par le FA. 2° L'oxydation du fumarate est fortement inhibée (courbes 3 et 4) ; en présence de FA, l'activité est réduite à celle de l'endogène (courbe 10). 3° Dans le cas du succinate (courbes 5 et 6), l'inhibition est faible durant les 20 premières minutes, mais elle s'accroît nettement par la suite. 4° Si le FA est ajouté en même temps que l'acétate (courbes 7 et 8), il ne se produit pas d'inhibition. 5° En revanche, lorsque le FA est ajouté aux cellules 60 min. avant le substrat (courbe 9), l'oxydation de l'acétate est presque complètement bloquée pendant 15 min. puis tend à redevenir normale. Les observations précédentes appellent quelques remarques. Il est nor-

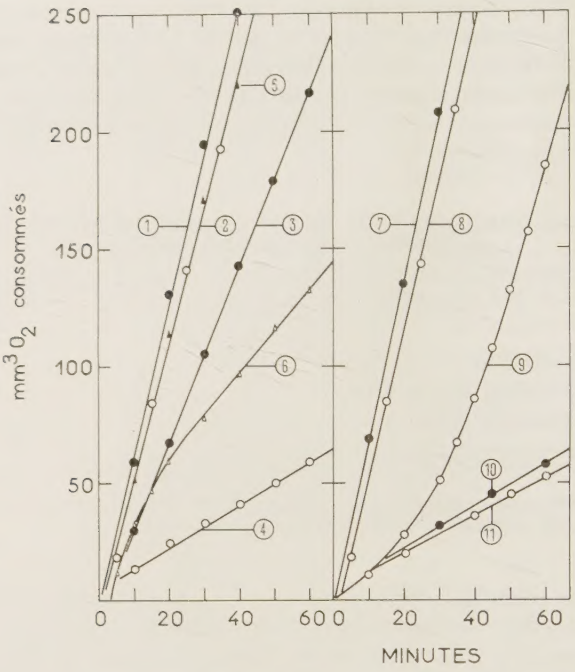


FIG. 1. — Inhibition par le FA de la respiration de $O_2$ par des cellules intactes en présence de différents métabolites carbonés. Chaque système manométrique contient : tampon phosphates, pH = 7 ; bactéries (culture aérobie sur le milieu de base habituel avec glucose), 5,9 mg (poids sec) ; chloramphénicol, 150 $\mu$g ; métabolite carboné, 10 $\mu$moles ; volume total, 3 ml ; KOH (puits central). Phase gazeuse, air. Température, 37°. Le FA est employé à la concentration $10^{-3}$ M. Lorsque aucune précision n'est donnée, le FA a été ajouté aux bactéries soixante minutes avant le temps 0. La solution contenant le métabolite carboné est placée dans le diverticule et renversée dans la coupe au temps 0. (1) = glucose. (2) = glucose + FA. (3) = fumarate. (4) = fumarate + FA. (5) = succinate. (6) = succinate + FA. (7) = acétate. (8) = acétate + FA [FA est ajouté en même temps que l'acétate]. (9) = acétate + FA [FA ajouté soixante minutes avant l'acétate]. (10) = endogène. (11) = endogène + FA.

mal que la consommation de $O_2$ mesurée en présence d'un excès de glucose soit insensible au FA car la conversion en acétyl-CoA ne met pas en jeu le cycle de Krebs. Cela suggère que le FA n'exerce aucune action inhibitrice sur la glycolyse, la chaîne respiratoire et la décarboxylation oxydative du pyruvate. Voici comment on peut expliquer la cinétique très particulière observée dans le cas du succinate (courbe 6). Durant la période qui correspond à la première partie de la courbe, une seule réaction semble se produire, l'oxydation

du succinate en fumarate ; celle-ci est catalysée par la succinate-déshydrogénase et n'est pas sensible au fluorocitrate. Ensuite, l'oxydation du fumarate est fortement inhibée en présence de FA et la dernière partie de la courbe 6 tend à devenir parallèle à la courbe 4. Examinons maintenant le cas de l'acétate. L'action du fluorocitrate sur l'aconitase étant de nature compétitive, le taux d'inhibition est déterminé par la valeur du rapport (fluorocitrate)/(citrate). Au temps O de l'essai correspondant à la courbe 9, une quantité appréciable de FA a déjà vraisemblablement été convertie en fluorocitrate, mais, dès l'addition de l'acétate, les cellules commencent à former du citrate et le rapport précédent tend à baisser, entraînant au bout d'un certain temps une diminution du degré d'inhibition puis la disparition complète de celle-ci. Quand le FA et l'acétate sont ajoutés en même temps à la suspension (courbe 8), les bactéries ne contiennent pas de fluorocitrate au temps O ; durant toute la durée de l'expérience le rapport (fluorocitrate)/(citrate) se maintiendra à un niveau relativement bas et l'inhibition ne pourra jamais se manifester.

Dans la plupart de nos essais, une accumulation de citrate consécutive à l'inhibition se produit. Bien que subissant des fluctuations importantes d'une expérience ou d'un substrat à l'autre, celle-ci demeure généralement inférieure à 50 µg/mg de cellules (poids sec). Aucune accumulation de citrate ne se manifeste dans les témoins sans FA contenant les bactéries, le tampon et le substrat carboné. La respiration due aux substances cellulaires endogènes, qui est peu sensible à l'action de FA (courbes 10 et 11), donne lieu néanmoins à une accumulation notable de citrate.

D'une façon générale, l'inhibition provoquée par le FA et l'accumulation de citrate qui en résulte suggèrent fortement que le cycle de Krebs joue un rôle important, si ce n'est unique, dans l'oxydation aérobie de l'acétate et des acides dicarboxyliques chez *A. aerogenes*.

5° Recherche des enzymes dans les extraits. — Toutes les enzymes du cycle de Krebs ont été trouvées dans les extraits préparés à partir de suspensions récoltées durant la phase exponentielle de cultures aérobies sur les substrats carbonés suivants : glucose, pyruvate, acétate, citrate, succinate et fumarate (tableau IV). Les activités spécifiques les plus élevées sont observées généralement avec les malate- et isocitrate-déshydrogénases. Dans trois cas : cultures en phase exponentielle sur glucose, glucose + citrate ou fumarate, l'activité fumarase est nulle ; ce résultat négatif s'explique vraisemblablement par une inactivation de l'enzyme durant la préparation des extraits. Les deux enzymes qui sont responsables de la conversion de l'acétate en acétyl-CoA, l'acétokinase et la phospho-transacétylase, sont toujours présentes. L'isocitratase, qui catalyse la première étape du shunt du glyoxylate [18], est formée par plusieurs

cultures. La seconde enzyme de cette voie, la malate-synthétase, a été décelée dans les extraits de cultures stationnaires aérobies sur glucose, pyruvate ou citrate. Les observations précédentes indiquent qu'*A. aerogenes* possède un équipement enzymatique complet lui permettant d'oxyder et d'assimiler le pyruvate, l'acétate et les différents membres du cycle de Krebs.

Tableau IV. — **Activités enzymatiques d'extraits de cultures aérobies.**

| Enzymes | Aliments carbonés | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Glucose | Glucose | Glucose + Citrate | Pyruvate | Acétate | Citrate | Succinate | Fumarate |
| | E | S | E | E | E | E | E | E |
| Enzyme de condensation | 2 | 36 | 2,8 | 6,3 | 42 | 7,4 | 6,2 | 8 |
| Aconitase | 3,2 | 14 | 2,3 | 8 | 8 | 17,5 | 7 | 8 |
| Isocitrate - déshydrogénase | 170 | 180 | 110 | 190 | 370 | 190 | 216 | 170 |
| Cétoglutarate-déshydrogénase | 3,6 | 12 | 3,9 | 16 | 26 | 3,5 | 2,6 | 2 |
| Succinate - déshydrogénase | 3,6 | 14 | 4 | 54 | 44 | 33 | 42 | 22,5 |
| Fumarase | 0 | 236 | 0 | 200 | 660 | 400 | 300 | 0 |
| Malate - déshydrogénase | 310 | 730 | 246 | 960 | 1 500 | 800 | 615 | 460 |
| Isocitratase | 4 | 60 | | 6,7 | 67 | 110 | 2,8 | 3,4 |
| Acétokinase | 150 | 460 | 105 | 380 | 105 | 184 | 170 | 180 |
| Phosphotransacétylase | 2 | 39 | 3,1 | 5,5 | 38 | 3,3 | 7,5 | 8,5 |

E = extraits de cellules récoltées pendant la phase exponentielle. S = extraits de cellules récoltées durant la phase stationnaire vingt-quatre heures environ après le moment de l'ensemencement. Toutes les activités sont exprimées en $\mu$moles du substrat par heure et par milligramme d'azote.

## II. — Régulation de la biosynthèse des enzymes.

1° Cultures aérobies. — Reportons-nous au tableau IV et comparons les activités spécifiques obtenues avec les cultures sur glucose en phase exponentielle, glucose en phase stationnaire et acétate. Dans le cas des isocitrate- et malate-déshydrogénases on observe des variations de faible amplitude et peu significatives. En revanche, les niveaux de l'enzyme de condensation, de la cétoglutarate-déshydrogénase, de la succinate-déshydrogénase, de l'isocitratase et de

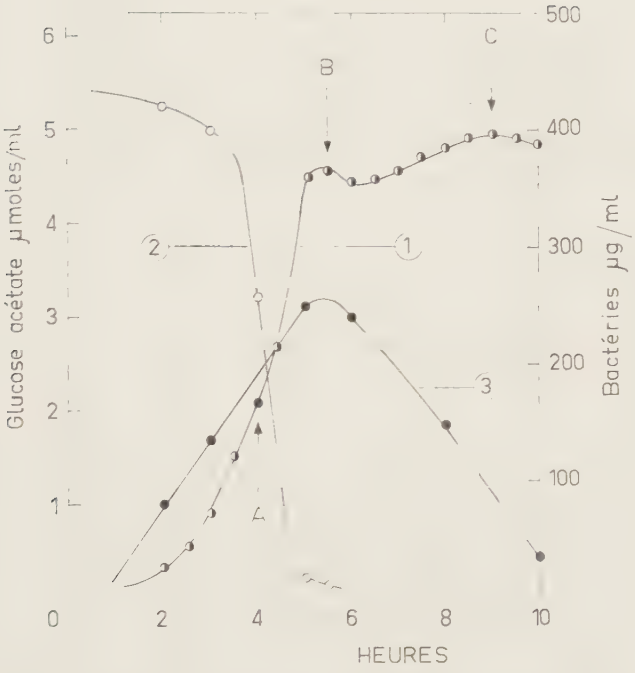


FIG. 2. — Production et dégradation de l'acétate durant la croissance aérobie sur un milieu synthétique contenant initialement du glucose comme seule source de carbone et d'énergie. Conditions expérimentales : température, 37° ; pH = 7 ; glucose, 1 mg/ml ; source d'azote, $NH_4^+$. (1) = croissance bactérienne. (2) = concentration du glucose. (3) = concentration de l'acétate. Les flèches A, B et C indiquent les moments où ont été effectués les prélèvements de bactéries destinés à la préparation des extraits enzymatiques. L'acide acétique a été dosé avec une solution de NaOH titrée après entraînement à la vapeur.

la phospho-transacétylase augmentent respectivement de 18, 3, 4, 15 et 20 fois lorsqu'on passe d'une culture sur glucose en phase exponentielle à une autre culture sur le même milieu mais en phase stationnaire. De plus, les cultures en phase exponentielle sur acétate et les cultures en phase stationnaire sur glucose fournissent sensiblement les mêmes activités pour toutes les enzymes dosées.

Parvenus à ce stade, nous avons jugé nécessaire de faire une expérience plus complète, au cours de laquelle nous avons mesuré simultanément la densité bactérienne de la culture, la disparition du glucose, l'accumulation puis la disparition de l'acétate, et dosé toutes les enzymes du cycle dans les cellules prélevées en trois moments distincts de la croissance marqués par les flèches A, B et C sur la figure 2. Les prélèvements destinés à la préparation des extraits

devant porter sur des volumes de plusieurs dizaines de litres, l'expérience a été effectuée dans un fermenteur contenant 100 l de milieu aéré par agitation, à 33°. Les résultats représentés sur la figure 2 dévoilent un phénomène intéressant. Une accumulation importante d'acétate se produit pendant la phase exponentielle. Mais, lorsqu'à la suite de l'épuisement du milieu en glucose la croissance s'arrête, l'acétate formé est à son tour oxydé, provoquant

Fig. 3. — Variations des activités spécifiques des extraits en fonction de l'âge physiologique des cellules. Les résultats consignés sur ce tableau complètent ceux qui sont représentés sur la figure 2. (A) = milieu de la phase exponentielle. (B) = période d'arrêt de la croissance. (C) = phase stationnaire. On attribue arbitrairement la valeur 100 à l'activité de l'extrait le plus actif. (1) = enzyme de condensation. (2) = aconitase. (3) = isocitrate-déshydrogénase. (4) = cétoglutarate-déshydrogénase. (5) = succinate-déshydrogénase. (6) = fumarase. (7) = malate-déshydrogénase.

ainsi, après une phase stationnaire de faible durée, l'apparition d'une nouvelle phase de développement peu accentuée. On se trouve ici en présence d'une sorte de diauxie [**22**]. Le glucose est oxydé plus vite que l'acétate, et tout se passe comme si, dans les conditions de nos expériences, la glycolyse fonctionnait plus rapidement que le cycle de Krebs. Sur la figure 3, sont rapportées les activités spécifiques correspondant aux trois prélèvements effectués au cours de l'expérience précédente. Dans l'ensemble, le niveau de la plu-

part des enzymes augmente lorsque la culture passe de la phase exponentielle (A) à la phase d'arrêt (B), et de celle-ci à la seconde phase de développement (C). Les différences sont particulièrement marquées pour l'enzyme de condensation, l'aconitase, les cétoglutarate- et succinate-déshydrogénases. Ainsi, en aérobiose, la synthèse de plusieurs enzymes est accrue lorsque le glucose est épuisé. Revenons un instant aux résultats consignés sur le tableau I et comparons les activités respiratoires mesurées en présence de différents donateurs de cellules récoltées en phase exponentielle et de cellules recueillies en phase stationnaire, sur glucose, en aérobiose : les premières oxydent l'acétate, le succinate, le fumarate et le malate, respectivement 5, 8,5, 7,5 et 5 fois plus lentement que les secondes Ces résultats concordent avec ceux que fournissent les dosages d'enzymes et suggèrent que le fonctionnement du cycle de Krebs doit être ralenti d'au moins cinq fois lorsque l'organisme croît en présence de glucose.

Il est surprenant que les cultures aérobies en phase exponentielle sur citrate synthétisent des quantités élevées d'isocitratase car cette enzyme intervient seulement dans l'assimilation de l'acétate. En revanche, on pouvait logiquement s'attendre à ce qu'elle disparût presque complètement dans les cultures sur pyruvate, succinate ou fumarate, puisque sa formation est normalement abolie par les acides dicarboxyliques en $C_4$ et le pyruvate chez *E. coli* [19]. L'enzyme de condensation et la phospho-transacétylase atteignent leurs niveaux les plus élevés dans les cultures sur acétate. En revanche, la teneur en acétokinase reste pratiquement invariable quels que soient les aliments carbonés présents dans le milieu. L'addition de glucose à une culture sur citrate réduit les activités de l'enzyme de condensation, de l'aconitase et de la succinate-déshydrogénase, résultat qui confirme les précédents et indique que la formation de ces enzymes est soumise à une répression catabolique.

2° Culture anaérobies. — Reportons-nous aux tableaux IV et V. Nous pouvons faire les observations suivantes : 1° La malate-déshydrogénase atteint son plus bas niveau dans les cultures anaérobies sur glucose. 2° La fumarase est synthétisée à un niveau très élevé dans les cultures anaérobies sur pyruvate avec fumarate. 3° Quels que soient le substrat fermentescible et l'accepteur d'hydrogène, l'isocitratase n'est jamais formée en l'absence de $O_2$. 4° Les conditions de croissance n'influent pas sur la teneur en acétokinase. 5° Les faibles activités trouvées pour l'aconitase, les cétoglutarate- et succinate-déshydrogénases dans les cultures anaérobies sur glucose, pyruvate ou citrate avec $NO_3^-$ conduisent à penser que le cycle ne peut fonctionner comme voie oxydative lorsque *A. aerogenes* respire le nitrate. 6° La présence de toutes les enzymes du cycle, y compris la succinate-déshydrogénase, dans les cultures anaérobies sur pyru-

vate + fumarate et sur citrate apporte un argument favorable à l'idée selon laquelle leur formation ne requerrait point la présence de l'oxygène comme inducteur et explique que les cellules cultivées dans de telles conditions oxydent en présence de $O_2$, l'acétate, le succinate, le fumarate et le malate (tableau II).

### III. — Rôle joué par le cycle tricarboxylique au cours de la respiration anaérobie du nitrate.

1° Observations préliminaires. — *M. denitrificans* pousse en anaérobiose dans un milieu synthétique contenant du nitrate et du succinate ou de l'acétate. Dans ces conditions, l'oxydation des aliments carbonés est couplée avec la réduction de $NO_3^-$ par l'intermédiaire du cycle de Krebs [8]. On pouvait naturellement s'attendre à trouver une situation semblable chez une bactérie comme *A. aerogenes* qui possède la même nitrate-réductase respiratoire que *M. denitrificans* [31].

La souche L III-I est repiquée sur des tubes dans lesquels se trouve un milieu synthétique contenant, en plus des sels minéraux habituels, du nitrate de potassium et l'un des aliments carbonés ci-dessus. Après scellement sous vide, ils sont mis en incubation à 32°. Même après plusieurs jours, la croissance observée est pratiquement nulle ou négligeable. Par conséquent, contrairement à nos prévisions, *A. aerogenes* ne peut assimiler le succinate ou l'acétate lorsque le nitrate est le seul substrat respiratoire mis à sa disposition. Cela nous a conduits à prendre en considération les hypothèses explicatives suivantes : 1° Une ou plusieurs enzymes du cycle ne sont pas présentes dans les cellules qui respirent $NO_3^-$ en anaérobiose, leur formation exigeant $O_2$ comme inducteur [30]. 2° En raison de l'absence d'un transporteur d'électrons indispensable (cytochrome, par exemple), il n'existe pas de couplage entre une ou plusieurs déshydrogénases du cycle et la chaîne respiratoire conduisant à $NO_3^-$. 3° Pour qu'un organisme puisse se développer aux dépens d'un substrat non fermentescible en présence d'un accepteur externe d'hydrogène, il faut que des phosphorylations oxydatives se produisent pendant le transfert des électrons. Autrement dit, la croissance anaérobie sur succinate ou acétate sera impossible si la respiration de $NO_3^-$ n'est pas accompagnée d'une synthèse d'ATP. 4° Lorsque *A. aerogenes* croît en anaérobiose en présence de $NO_3^-$, une accumulation importante de nitrite pouvant atteindre plusieurs centaines de milligrammes de $KNO_2$ par litre se produit. A de telles concentrations, celui-ci peut inactiver une ou plusieurs enzymes du cycle. En effet, dans certaines conditions, l'ion $NO_2^-$ se montre très réactif à l'égard de quelques groupements des protéines et peut, par exemple, provoquer une désamination des $-NH_2$ ou une oxydation des -SH.

L'hypothèse 1 est en accord avec les observations d'Englesberg et Levy [6] qui suggèrent que, chez *Pasteurella pestis*, l'aérobiose favorise la biosynthèse de l'enzyme de condensation, de l'aconitase, de l'isocitrate-déshydrogénase, de la fumarase et de la malate-déshydrogénase. Mais, dans le cas présent, elle se trouve pratiquement exclue par deux faits expérimentaux qui ont déjà été soulignés : 1° Les cellules cultivées en anaérobiose sur pyruvate + fumarate ou sur citrate oxydent l'acétate et plusieurs acides dicarboxyliques

TABLEAU V. — **Activités enzymatiques d'extraits de cultures anaérobies.**

| ENZYMES | ALIMENT CARBONÉ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Glucose | | Pyruvate | | Citrate | |
| | ACCEPTEUR D'HYDROGÈNE | | | | | |
| | | Nitrate | Fumarate | Nitrate | | Nitrate |
| Enzyme de condensation ... | 5,4 | 4,2 | 11 | 7,1 | 6,9 | 6 |
| Aconitase ..... | 0,8 | 0,5 | 21 | | 7 | 3,5 |
| Isocitrate-déshydrogénase.... | 47 | 84 | 110 | 185 | 200 | 205 |
| Cétoglutarate-déshydrogénase. | 0,4 | 0,8 | 8 | 6,5 | 15 | 14 |
| Succinate-déshydrogénase.... | 0,7 | 0,35 | 12,5 | 1 | 10,5 | 2,05 |
| Fumarase..... | 0 | 0 | 3 100 | 0 | 420 | 0 |
| Malate-déshydrogénase ..... | 23 | 64 | 260 | 170 | 285 | 240 |
| Isocitratase ..... | 0,1 | 0,2 | 0,7 | 0,3 | 0,9 | 0,5 |
| Acétokinase ..... | 305 | 312 | 187 | 177 | 150 | 130 |
| Phosphotransacétylase ..... | 5 | 4,2 | 6,1 | 8 | 8,5 | 4 |

Les extraits ont été préparés à partir de cellules récoltées durant la phase stationnaire vingt-quatre heures environ après le moment de l'ensemencement. Toutes les activités sont exprimées en $\mu$moles du substrat par heure et par milligramme d'azote.

membres du cycle (tableau II). 2° Toutes les enzymes du cycle sont présentes à des niveaux relativement élevés dans ces cultures (tableau V) et la présence de $O_2$ n'est donc nullement nécessaire à leur synthèse.

Nous allons maintenant examiner séparément les hypothèses 2 et 4.

2° COUPLAGE ENTRE LES DÉSHYDROGÉNASES DU CYCLE ET LA RÉDUCTION DE $NO_3^-$. — Tout d'abord, nous avons recherché si des cellules possédant la nitrate-réductase se montraient capables de réduire $NO_3^-$ en $NO_2^-$

lorsqu'on les place en présence de différents donneurs d'hydrogène physiologiques. Ici quelques remarques s'imposent. L'oxygène inhibant le fonctionnement de la nitrate-réductase [**32**], tous nos essais devront obligatoirement être effectués en anaérobiose. De plus, il faudra se servir de cultures anaérobies car $O_2$ réprime aussi la formation de l'enzyme [**32**]. Deux cultures différentes ont été employées, l'une, sur glucose + $NO_3^-$, l'autre, sur citrate sans $NO_3^-$. Il a été vérifié que des bactéries cultivées en anaérobiose sur citrate sans $NO_3^-$ synthétisaient la nitrate-réductase de base à un niveau relativement élevé. Parmi les donneurs d'hydrogène employés figurent plusieurs membres du cycle : le succinate, le citrate, le cétoglutarate, le fumarate et le malate, ainsi que les composés suivants : glucose, pyruvate, lactate, formiate, 2,3-butanediol, éthanol et acétate. L'organisme utilisé possède des enzymes qui catalysent la déshydrogénation du pyruvate, des D- et L-lactates [**26**], du 2,3-butanediol, de l'éthanol et probablement aussi du formiate. Un témoin sans donneur d'hydrogène exogène permet de mesurer la vitesse de la réduction endogène du nitrate. Celle-ci est déduite des valeurs

Tableau VI. — **Réduction du nitrate en nitrite par des suspensions cellulaires placées en présence de différents donneurs d'hydrogène en anaérobiose.**

| Aliment carboné présent dans la culture | Donneur d'hydrogène | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Glucose | Pyruvate | Lactate | Formiate | 2,3-butanediol | Éthanol | Acétate | Succinate | Citrate | Cétoglutarate | Fumarate | Malate |
| | Activités | | | | | | | | | | | |
| Glucose ..... | 3,25 | 1 | 1,65 | 1,7 | 1,5 | 0,85 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,1 | 0,15 |
| Citrate ..... | | 1,55 | 1,83 | 1,89 | 0,76 | 1,04 | 0 | 1,05 | 1,1 | 1,2 | 1,65 | 0,66 |

Les suspensions cellulaires sont obtenues à partir de cultures anaérobies sur glucose avec $NO_3^-$ et sur citrate sans $NO_3^-$. Chaque système contient : tampon phosphates pH = 7 ; bactéries, 40 mg (poids sec) ; chloramphénicol, 1 mg ; donneur d'hydrogène, 1 000 $\mu$moles ; $KNO_3$, 500 $\mu$moles ; volume total, 20 ml. Température, 37°. L'anaérobiose est réalisée en plaçant le mélange dans des tubes à essais non aérés. On laisse incuber pendant dix minutes les cellules avec le tampon, le chloramphénicol et le donneur d'hydrogène avant l'addition de $KNO_3$. La solution de nitrate est ajoutée au temps 0. Des prélèvements de 1 ml destinés au dosage de $NO_2^-$ sont effectués toutes les dix minutes pendant une heure. Durant toute cette période, la vitesse de formation du nitrite reste constante. Celle-ci est exprimée en $\mu$moles de $NO_2^-$ par heure et par milligramme de cellules (poids sec).

observées avec les essais réels. Les résultats sont consignés sur le tableau VI. Dans le cas des deux cultures, les bactéries réduisent le nitrate en présence des composés suivants : pyruvate, lactate, formiate, 2,3-butanediol et éthanol. Les systèmes avec acétate sont toujours inactifs. Enfin, seules les cellules issues de la culture sur citrate sans $NO_3^-$ utilisent le succinate, le citrate, le cétoglutarate, le fumarate et le malate comme donneurs d'hydrogène avec une vitesse appréciable. Que faut-il conclure ? L'inactivité à l'égard des membres du cycle des cellules cultivées en anaérobiose en présence de $NO_3^-$ ne doit point surprendre puisque certaines enzymes sont absentes (ou présentes sous une forme inactive) dans les extraits préparés à partir de ces cultures (tableau V). De toute façon, le fait que les bactéries issues de la culture sur citrate réduisent $NO_3^-$ en $NO_2^-$ en présence de succinate, de citrate, de cétoglutarate et de fumarate suggère que les succinate-, isocitrate- et malate-déshydrogénases doivent être couplées, *in vivo*, avec la nitrate-réductase. Dans le cas de l'acétate, l'absence d'activité est inexpliquée.

TABLEAU VII. — **Production de $CO_2$ par une suspension cellulaire placée en présence de différents donneurs d'hydrogène et utilisant $O_2$ ou $NO_3^-$ comme oxydants.**

| OXYDANT | DONNEUR D'HYDROGÈNE | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Acétate | Succinate | Citrate | Cétoglutarate | Fumarate | Malate |
| | ACTIVITÉS | | | | | |
| Oxygène ..... | 1,35 | 7,15 | 6,25 | 4,4 | 11,2 | 11,7 |
| Nitrate..... | 0 | 1,1 | 0,9 | 1 | 4,25 | 5,35 |
| Sans oxydant .. | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,25 | 5,3 |

Les cellules sont obtenues à partir d'une culture anaérobie sur citrate sans $NO_3^-$. Les vitesses de production de $CO_2$ sont déterminées avec la méthode manométrique de Warburg à 37°. Dans le cas de $O_2$, on utilise chaque fois deux systèmes manométriques distincts, l'un avec KOH dans le puits central, l'autre sans KOH. Dans le cas de $NO_3^-$, un seul système suffit, mais l'expérience est faite en atmosphère de $N_2$. Les systèmes contiennent : tampon phosphates pH = 6 ; bactéries, 3 mg (poids sec) ; donneur d'hydrogène, 10 $\mu$moles ; volume total, 3 ml. La solution contenant le donneur d'hydrogène est placée dans le diverticule et renversée dans la coupe au temps 0. On place également dans le diverticule, quand il y a lieu, la solution de $KNO_3$ (50 $\mu$moles). Lorsque $O_2$ est l'oxydant, on estime la production endogène de $CO_2$ dans un système où le donneur d'hydrogène est omis. Celle- ci est déduite des activités trouvées. En anaérobiose, avec $NO_3^-$ comme oxydant, la production endogène de $CO_2$ est pratiquement négligeable. Les activités sont exprimées en $\mu$moles de $CO_2$ dégagées par heure et par milligramme de cellules (poids sec).

Au cours d'une autre expérience, nous avons mesuré les vitesses auxquelles le $CO_2$ est produit pendant l'oxydation par $NO_3^-$ et $O_2$ de quelques-uns des donneurs d'hydrogène précédents. On se sert d'une suspension cellulaire provenant d'une culture anaérobie sur citrate. Des témoins sans $NO_3^-$ ni $O_2$ sont effectuées en anaérobiose sous une atmosphère de $N_2$. Dans l'ensemble, les résultats (tableau VII) concordent avec ceux de l'expérience précédente. Avec l'acétate, l'activité est nulle en présence de $NO_3^-$, faible en présence de $O_2$. Ce sont les systèmes contenant le succinate, le citrate et le cétoglutarate qui fournissent les résultats les plus significatifs : la vitesse de production du $CO_2$ est nulle en l'absence d'oxydant, élevée en présence de $O_2$, faible mais encore significative en présence de $NO_3^-$. Dans le cas du fumarate et du malate, aucune conclusion ne peut être tirée, car ces deux acides sont fermentés et donnent une production importante de $CO_2$ en l'absence de tout accepteur externe.

Il fallait encore s'assurer que, *in vitro,* les trois déshydrogénases du cycle étaient couplées avec la nitrate-réductase. Voici comment nous avons opéré. On utilise encore une culture anaérobie sur citrate sans $NO_3^-$. Les extraits sont préparés suivant la méthode habituelle. Les donneurs d'hydrogène employés sont les suivants : malate, 2,3-butanediol, éthanol, succinate et isocitrate. Les essais sont faits dans des tubes non agités, c'est-à-dire dans des conditions pratiquement anaérobies. La température est 37°. Tous les systèmes contiennent : tampon tris pH = 7,2, 500 µmoles ; donneur d'hydrogène, 400 µmoles ; $KNO_3$, 500 µmoles ; extrait bactérien, volume correspondant à 5 mg d'azote, eau pour compléter le volume total à 20 ml. Pour accroître les vitesses de réaction, il s'est révélé nécessaire d'ajouter 300 µg de FMN dans tous les systèmes, excepté celui du succinate. Les systèmes avec malate, 2,3-butanediol ou éthanol contenaient en plus 4 µmoles de DPN, ceux avec isocitrate, 4 µmoles de TPN. Ces additions de cofacteurs sont rendues nécessaires par le fait que les malate-, butanediol-, éthanol- et isocitrate-déshydrogénases sont des enzymes à pyridine-nucléotides ; les trois premières exigeant le DPN, et la quatrième, le TPN. Dans le système avec éthanol, on ajoute aussi 200 µmoles de bisulfite de sodium ; ce composé entre en combinaison avec l'acétaldéhyde formée pendant la réaction, provoquant ainsi un déplacement de l'équilibre favorable à la réduction de $NO_3^-$. La solution de $KNO_3$ est ajoutée au temps O, puis des prélèvements de 1 ml destinés au dosage du nitrite sont effectués toutes les 10 min. et placés dans 3 ml d'acétone. Tous les systèmes réduisent $NO_3^-$ en $NO_2^-$, le plus actif étant celui du malate (fig. 4). Nous avons vérifié que l'addition d'un inhibiteur spécifique de la succinate-déshydrogénase, le malonate (2 000 µmoles/20 ml), bloquait complètement la réduction du nitrate aux dépens du succinate.

De tous les résultats précédents, nous déduisons que l'hypothèse 2 doit être abandonnée.

3° Effet inhibiteur du nitrite. — Au cours d'une première expérience, nous avons étudié l'action de $NO_2^-$, en l'absence de $O_2$, sur

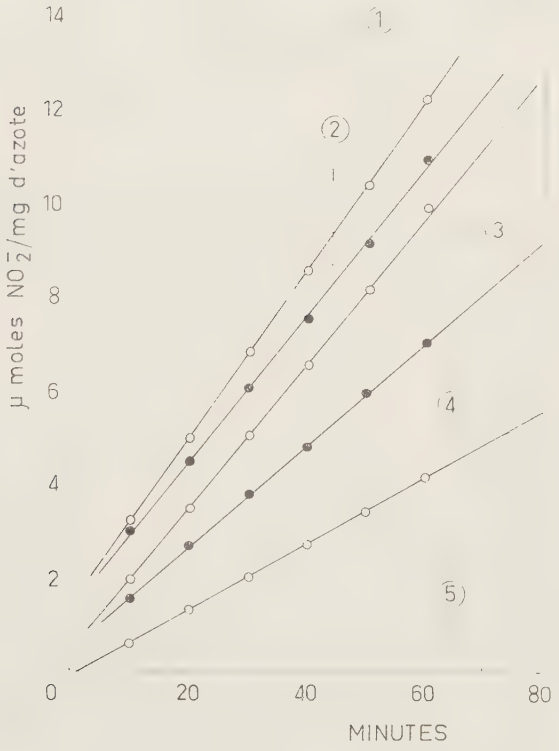


Fig. 4. — Réduction du nitrate en nitrite, en présence de différents donateurs d'hydrogène physiologiques, par des extraits enzymatiques. (1) = malate. (2) = 2,3-butanediol. (3) = éthanol. (4) = succinate. (5) = isocitrate. Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte.

des suspensions cellulaires lavées provenant de cultures anaérobies sur pyruvate + fumarate et sur citrate. Une concentration relativement élevée de $NaNO_2$ (2 g/l) est utilisée. On détermine les pourcentages d'inhibition pour chacune des six enzymes éprouvées en comparant les activités obtenues après le traitement à celles de sys-

tèmes témoins sans $NO_2^-$ (tableau VIII). Il est facile de tirer les conclusions. Les activités succinate-déshydrogénase et fumarase disparaissent complètement. En revanche, l'aconitase, l'isocitrate-déshydrogénase et la cétoglutarate-déshydrogénase ne subissent qu'une inactivation partielle. Quant à la malate-déshydrogénase, elle paraît peu ou pas sensible à l'action de $NO_2^-$. Il faut bien préciser que les inhibitions observées ici sont de type irréversible puisque, après

TABLEAU VIII. — **Inactivation par le nitrite des enzymes à l'état intracellulaire.**

| ALIMENTS CARBONÉS PRÉSENTS DANS LA CULTURE | | ACTIVITÉS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aconitase | Isocitrate-déshydrogénase | Succinate-déshydrogénase | Fumarase | Cétoglutarate-déshydrogénase | Malate-déshydrogénase |
| Pyruvate + Fumarate | Témoin | 61 | 89 | 30,5 | 810 | 29 | 415 |
| | Traité par $NO_2^-$ | 47 | 89 | 0 | 0 | 20 | 345 |
| | % d'inhibition | 23 | 0 | 100 | 100 | 31 | 17 |
| Citrate | Témoin | 11 | 150 | 25 | 360 | 4,6 | 212 |
| | Traité par $NO_2^-$ | 8,5 | 125 | 0 | 0 | 3,1 | 240 |
| | % d'inhibition | 22 | 16 | 100 | 100 | 32 | 0 |

Les suspensions cellulaires lavées provenant de cultures anaérobies sans $NO_3^-$ sont partagées en deux fractions. L'une de celles-ci est mise en incubation anaérobie pendant deux heures dans une solution tamponnée (phosphates, pH = 7) avec $NaNO_2$ (2 g/l) à 37°. L'autre, qui sert de témoin, est placée en incubation, dans des conditions identiques, dans la solution tamponnée mais sans $NO_2^-$. Ensuite, les bactéries sont lavées plusieurs fois jusqu'à élimination complète du nitrite et remises en suspension. Pour préparer les extraits, on se sert de la méthode habituelle. Les activités sont exprimées en $\mu$moles du substrat par heure et par milligramme d'azote.

l'incubation, les cellules ont été complètement débarrassées du nitrite par lavage. Soulignons un point important et inexpliqué. L'effet du nitrite est beaucoup moins accusé lorsqu'on réalise l'expérience précédente avec des bactéries provenant de cultures aérobies.

Ensuite, nous avons examiné l'effet de $NO_2^-$ sur les enzymes du cycle, l'isocitratase, l'acétokinase et la phospho-transacétylase pendant la croissance de cultures aérobies. Les résultats et le mode opératoire se trouvent sur le tableau IX. Les degrés d'inactivation les

plus élevés sont observés pour l'enzyme de condensation, la succinate-déshydrogénase, la fumarase, l'isocitratase et la phosphotransacétylase. Les autres enzymes sont touchées à des degrés variables, l'isocitrate-déshydrogénase étant la moins sensible.

Voici quelques résultats ayant trait à l'action de $NO_2^-$ *in vitro*. On ajoute la solution de $NaNO_2$ au système avant d'y introduire

TABLEAU IX. — **Inactivation par le nitrite des enzymes pendant la croissance.**

| CONDITIONS DE CROISSANCE | ACTIVITÉS | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Enzyme de condensation | Aconitase | Isocitrate-déshydrogénase | Cétoglutarate-déshydrogénase | Succinate-déshydrogénase | Fumarase | Malate-déshydrogénase | Isocitratase | Acétokinase | Phosphotransacétylase |
| Culture sans $NO_2^-$ ... | 36 | 22 | 176 | 12 | 28 | 236 | 730 | 60 | 460 | 39 |
| Culture avec $NO_2^-$ ... | 6,5 | 18 | 160 | 10 | 5,5 | 0 | 330 | 0,6 | 310 | 6,2 |
| % d'inhibition ..... | 82 | 18 | 9 | 16 | 80 | 100 | 57 | 99 | 32 | 84 |

Les deux cultures sont faites en aérobiose dans le milieu de base habituel tamponné à pH = 7 contenant du glucose (1 g/l) comme source de carbone, à 37°. A l'une de celles-ci, on ajoute du nitrite ($NaNO_2$, 0,5 g/l) en même temps que l'inoculum. Les bactéries sont récoltées pendant la phase stationnaire de la croissance puis lavées par centrifugation pour éliminer $NO_2^-$. Les extraits sont préparés par traitement sonique. Les activités sont exprimées en $\mu$moles du substrat par heure et par milligramme d'azote.

l'extrait. Ainsi, l'enzyme entre au même instant en contact avec l'inhibiteur et son substrat. Nous donnons pour chaque enzyme la concentration millimolaire de $NaNO_2$ qui produit une diminution d'activité de 50 p. 100 : enzyme de condensation, 110 ; aconitase, 6 ; isocitrate-déshydrogénase, 460 ; succinate-déshydrogénase, 240 ; fumarase, 60 ; malate-déshydrogénase, 200 ; isocitratase, 10 ; phosphotransacétylase, 110. Alors qu'elle subissait, *in vivo*, une inactivation relativement peu importante, l'aconitase devient, *in vitro*, l'enzyme la plus sensible à $NO_2^-$. La succinate-déshydrogénase donne lieu à la situation inverse puisqu'elle est manifestement plus sensible *in vivo* qu' *in vitro*. Ces divergences sont inexpliquées.

Nous avons étudié l'effet de différentes concentrations de $NO_2^-$ sur l'aconitase, *in vitro*. Il était intéressant de comparer les comportements de l'enzyme d'*A. aerogenes* et de celle de mammifère. On s'est servi d'une préparation partiellement purifiée d'aconitase de cœur de porc obtenue selon la méthode d'Anfinsen [1], la deuxième

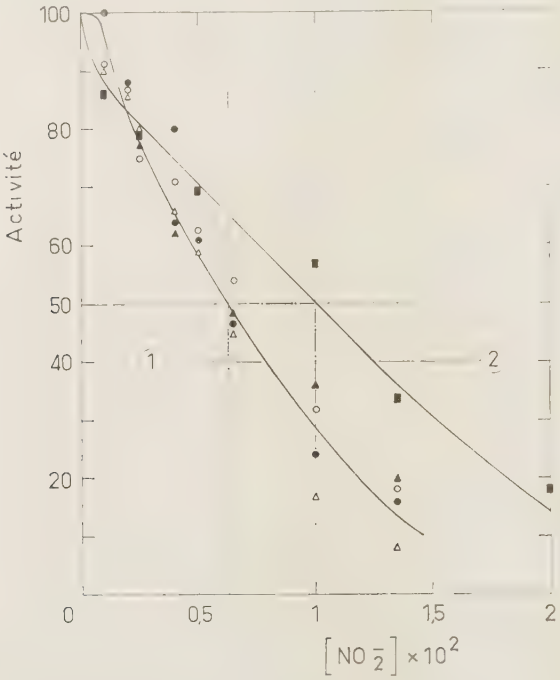


Fig. 5. — Variations de l'activité des aconitases d'*A. aerogenes* (courbe 1) et du cœur de porc (courbe 2) en fonction de la concentration du nitrite ($NaNO_2$). La solution de $NaNO_2$ est placée directement dans la cuve du spectrophotomètre avec le tampon et le substrat (citrate) ; l'extrait est ajouté au temps 0. L'enzyme entre donc en contact avec l'inhibiteur à l'instant même où la réaction débute. Dans le cas de l'aconitase d'*A. aerogenes*, quatre séries de mesures ont été faites avec quatre extraits différents provenant de cultures aérobies sur glucose en phase stationnaire. Les activités sont exprimées en p. 100 par rapport à celle du système sans nitrite. En abscisses, figure la concentration molaire multipliée par le facteur 100.

précipitation à l'éthanol constituant ici le dernier stade de la purification. On voit que les courbes sont très proches (fig. 5). Les deux enzymes sont donc à peu près aussi sensibles l'une que l'autre à l'action du nitrite.

Tous les résultats précédents apportent un soutien expérimental à l'hypothèse 4. L'action inhibitrice du nitrite sur plusieurs enzymes semble suffisamment forte pour bloquer le fonctionnement du cycle de Krebs, empêchant ainsi la croissance anaérobie en présence de $NO_3^-$ sur des composés carbonés, comme le succinate et l'acétate, qui, n'étant pas fermentescibles, ne peuvent être oxydés que par cette voie.

## IV. — Métabolisme du fumarate par les cultures anaérobies.

Les cultures anaérobies d'*A. aerogenes* contenant du glucose et du fumarate synthétisent des quantités élevées de fumarase [7] et de fumarate-réductase [29]. On pouvait donc s'attendre à ce que, dans celles-ci, le fumarate fût simultanément hydraté en L-malate et réduit en succinate, une compétition s'établissant ainsi entre les deux enzymes envers leur substrat commun.

Voici comment le succinate et le L- malate ont été identifiés. On utilise la technique de chromatographie de partage sur colonne d'acide silicique de Mallinckrodt proposée par Bové et Raveux [3] et qui permet de séparer et d'identifier les acides carboxyliques de $C_1$ à $C_6$. De nombreuses expériences ont été faites ; mais nous n'en décrirons qu'une seule. On se sert d'une culture anaérobie contenant par ml 600 µg de glucose et 1 500 µg d'acide fumarique neutralisé. Après 4 h. 30 de développement à 37°, le glucose est entièrement consommé et il reste 100 µg d'acide fumarique par ml ; la densité bactérienne est alors de 100 µg (poids sec) par ml. On centrifuge 100 ml de culture et on recueille le surnageant. Ce dernier est acidifié par addition de $H_2SO_4$ 18 N puis soumis à une extraction par l'éther pendant 48 heures dans un appareil à circulation continue. Le solvant est ensuite évaporé. Le résidu d'acides est neutralisé par NaOH, mélangé à 1 g de silice et acidifié par $H_2SO_4$ 5 N. On introduit l'échantillon précédent sur une colonne contenant déjà 8 g de silice mélangée à 2 ml de $H_2SO_4$ N. L'élution est faite successivement avec les mélanges suivants : 1° 108 ml de chloroforme lavé 92 p. 100 + butanol tertiaire 8 p. 100 ; 2° 44 ml de chloroforme lavé 87 p. 100 + butanol tertiaire 13 p. 100 ; 3° 88 ml de chloroforme lavé 72 p. 100 + butanol tertiaire 28 p. 100. Dans un collecteur, on recueille des fractions de 2 ml. L'acidité est titrée avec une solution de NaOH N/20 en présence de phénol-phtaléine. Les résultats sont rassemblés sur la figure 6. L'acide acétique sort en tête ; viennent ensuite dans l'ordre, l'acide fumarique, les acides succinique et lactique qui ne peuvent être séparés par la méthode employée et dont les pics sont confondus, et enfin l'acide malique qui donne un pic bien isolé dont la position correspond exactement à celle qu'ont indiquée les auteurs de la technique [3]. Ensuite, toutes les fractions correspondant au pic succinate + lactate sont rassemblées et évapo-

rées à sec. La même opération est effectuée avec les fractions du pic malate. Les résidus sont dissous dans un faible volume d'eau. Pour identifier l'acide succinique, on se sert de la méthode volumétrique classique basée sur l'emploi de la succinate-oxydase [**40**]. L'acide L-malique est identifié par mesure du point de fusion et du pouvoir

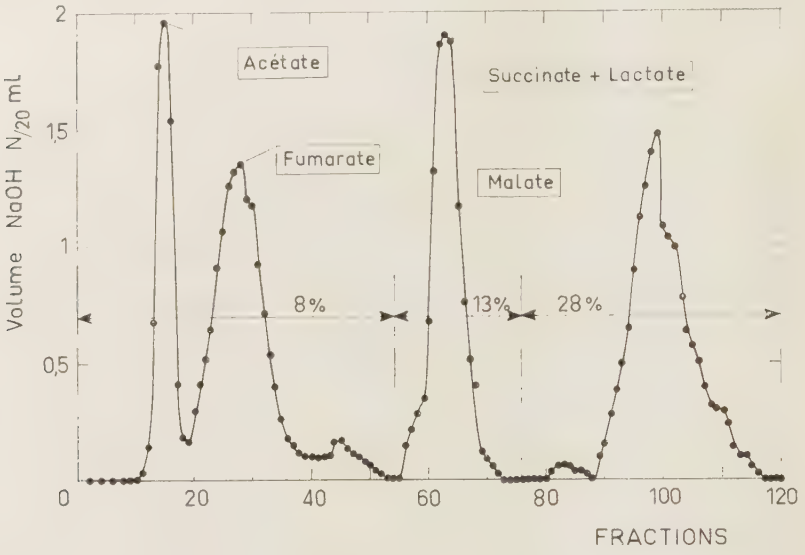


Fig. 6. — Identification des acides succinique et L-malique par chromatographie de partage sur colonne de silice. *Ordonnées :* Volume de NaOH N/20 versé pour neutraliser l'acidité. *Abscisses :* Numéros des fractions d'élution de 2 ml. Les 54 premières fractions sont éluées par le mélange contenant 8 p. 100 de butanol tertiaire, les 22 suivantes, par le mélange à 13 p. 100, et les 44 dernières, par le mélange à 28 p. 100.

rotatoire de son sel de cinchonine selon la technique de Korkes [**20**].

Les cultures anaérobies sur glucose + fumarate produisent toujours des quantités élevées des deux acides. Des déterminations quantitatives ont montré qu'il se formait en général à peu près autant de L-malate que de succinate [**7**].

## DISCUSSION

La dénitrification est un processus respiratoire qui confère à de nombreuses espèces bactériennes la faculté d'utiliser le nitrate comme accepteur ultime d'hydrogène à la place de l'oxygène. En 1953, Kluyver [**17**] proposa une classification rationnelle des organismes dénitrifiants reposant sur des critères physiologiques et com-

prenant essentiellement deux grands groupes qu'il est aisé de définir en donnant deux exemples. Une bactérie, comme *A. aerogenes,* possédant la propriété de respirer le nitrate, capable cependant de croître en anaérobiose dans un milieu contenant un substrat fermentescible dépourvu de tout accepteur externe d'électrons, entre dans la catégorie des dénitrifiants facultatifs (*incidental dissimilatory nitrate reduction*). Par contre, une espèce dépourvue de métabolisme fermentaire et qui ne peut jamais se développer en anaérobiose en l'absence d'un composé oxygéné de l'azote ($NO_3^-$, $NO_2^-$ ou $N_2O$), telle que *M. denitrificans,* appartient au groupe des dénitrifiants obligatoires (*true dissimilatory nitrate reduction*). Dans ce second cas seulement, la présence de nitrate, de nitrite ou d'oxyde nitreux est indispensable pour assurer la croissance de l'organisme dans un milieu privé d'oxygène. Les qualificatifs facultatif et obligatoire possèdent ici un sens restrictif et ne s'appliquent qu'aux conditions anaérobies de vie puisque la plupart des bactéries dénitrifiantes connues respirent l'oxygène et se développent en aérobiose dans un milieu dépourvu de nitrate.

Nos travaux antérieurs [**8, 30**] et ceux qui figurent dans le présent mémoire établissent l'existence du cycle de Krebs chez un représentant de chacun des groupes précédents. Dans le cas de *M. denitrificans* le cycle fonctionne aussi bien en anaérobiose en présence de $NO_3^-$ qu'en aérobiose [**8**], alors que chez *A. aerogenes* il agit seulement en présence d'oxygène. C'est pourquoi sans doute, des deux organismes précédents, seul *A. aerogenes* accumule de l'acétate dans un milieu anaérobie contenant du glucose et du nitrate [**7, 30**]. L'origine des comportements différents des deux bactéries doit vraisemblablement être recherchée dans l'action du nitrite. Le $NO_2^-$, qui est formé en grandes quantités par les cultures anaérobies avec $NO_3^-$ d'*A. aerogenes,* inactive l'enzyme de condensation, l'aconitase, la succinate-déshydrogénase et la fumarase, provoquant ainsi une inhibition presque complète du cycle. En revanche, dans les cultures anaérobies sur $NO_3^-$ de *M. denitrificans,* le $NO_2^-$ ne doit jamais s'accumuler à une concentration très élevée car il est réduit en $N_2$.

Chez les bactéries, le cycle tricarboxylique exerce généralement deux fonctions, l'une, oxydative et productrice d'énergie, et l'autre, nutritive. En particulier, il fournit à la cellule les squelettes carbonés à partir desquels sont formés de nombreux acides aminés, le fumarate et l'oxalacétate conduisant par exemple à l'aspartate, et le cétoglutarate, au glutamate. Il peut sembler étrange qu'*A. aerogenes* puisse synthétiser tous ses constituants cellulaires azotés et croître en anaérobiose dans un milieu glucosé synthétique contenant $NO_3^-$, puisque, dans ces conditions, le nitrite formé inactive plusieurs enzymes du cycle. L'explication suivante paraît vraisem-

blable : l'effet de $NO_2^-$ est suffisamment fort pour inhiber de façon presque complète la fonction oxydative qui exige une forte activité, mais encore trop faible pour empêcher la fonction nutritive qui requiert seulement une activité réduite.

Au cours de notre travail, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le passage des électrons entre les trois déshydrogénases du cycle et la nitrate-réductase ne donnerait point lieu à des phosphorylations oxydatives. Celle-ci va à l'encontre des conclusions de Hadjipetrou et Stouthamer [**13**] basées sur les valeurs des rendements matériels de la croissance et suivant lesquelles la réduction d'une mole de $NO_3^-$ par *A. aerogenes* fournirait trois moles d'ATP.

Lorsque notre souche se développe en aérobiose aux dépens du glucose, la glycolyse fonctionne probablement beaucoup plus vite que le cycle de Krebs, et il en résulte une accumulation importante d'acétate. Ce phénomène est dû, au moins en grande partie, à une répression catabolique de la biosynthèse des enzymes suivantes : enzyme de condensation, aconitase, isocitrate-déshydrogénase, cétoglutarate-déshydrogénase et succinate-déshydrogénase. Il semble assez répandu chez les bactéries douées d'un véritable métabolisme fermentaire puisqu'on l'a déjà observé dans les cultures de *Staphylococcus aureus* [**4**] et *E. coli* [**15**]. En revanche, il ne se manifeste pas dans les cultures sur glucose d'une espèce pourvue d'un métabolisme respiratoire obligatoire comme *M. denitrificans* [**8**]. Nous sommes là en présence d'un mécanisme de régulation qui confère à l'organisme le moyen d'utiliser comme source d'énergie la fermentation aérobie de préférence à la respiration de l'oxygène.

La fumarase donne lieu à une situation intéressante puisque sa formation est induite par son substrat et fortement accrue par les conditions anaérobies de vie. En l'absence de $O_2$, le fumarate est simultanément réduit en succinate et hydraté en L-malate. *In vivo,* s'établit donc une compétition entre la fumarate-réductase et la fumarase envers leur substrat commun, le fumarate. On est en droit de supposer que la conversion de grandes quantités de fumarate en L-malate ne procure aucun bénéfice à l'organisme.

L'acétokinase, qui catalyse la réaction réversible suivante :

$$\text{acétate} + \text{ATP} = \text{acétyl-phosphate} + \text{ADP}$$

joue sans doute un double rôle chez *E. coli* et *A. aerogenes* : dans les cultures aérobies sur acétate, elle est responsable de l'activation de cette molécule et de sa conversion en acétyl-phosphate ; en anaérobiose, elle catalyse la déphosphorylation de l'acétyl-phosphate formé à partir du pyruvate par la réaction phosphoroclastique. Il fallait donc s'attendre à trouver cette enzyme dans les cultures aérobies sur acétate et dans les cultures anaérobies sur glucose.

Au cours d'une importante étude faite sur *E. coli,* Gray, Wimpenny et Mossman [**12**] ont attiré l'attention sur certains problèmes

posés par la régulation de la biosynthèse des enzymes du cycle tricarboxylique. D'après ces auteurs, au moins trois facteurs sont susceptibles de jouer un rôle déterminant : 1° la présence ou l'absence de $O_2$ ; 2° l'effet répresseur du glucose ; 3° les importances respectives des demandes catabolique et anabolique qui sont imposées par les conditions de croissance. Quand une bactérie douée d'activité fermentaire se développe, en l'absence de $O_2$, dans un milieu complexe contenant tous les acides aminés ou vitamines, le cycle de Krebs n'est plus d'aucune utilité puisqu'il perd alors ses deux fonctions oxydative et nutritive. C'est sans doute la raison pour laquelle, en anaérobiose, *E. coli* [39] synthétise dix fois moins d'enzyme de condensation dans un milieu contenant, en plus du glucose, de l'extrait de levure et de l'hydrolysat de caséine, que dans un milieu à base de sels minéraux et de glucose. Toutes nos expériences ont été faites sur un milieu minimal et nous n'avons pas recherché quelle pouvait être l'influence des acides aminés et vitamines sur la formation des enzymes du cycle chez *A. aerogenes*.

## RÉSUMÉ

L'emploi de trois méthodes différentes a permis de démontrer l'existence du cycle tricarboxylique chez *A. aerogenes*. 1° *Technique de l'induction séquentielle :* les cellules adaptées à l'un des intermédiaires du cycle le sont aussi à l'égard de plusieurs autres. 2° *Action du fluoracétate :* le fluoracétate inhibe la respiration de $O_2$ en présence d'acétate, de fumarate ou de succinate comme donneurs d'électrons ; une accumulation de citrate accompagne généralement l'inhibition. 3° *Recherche des enzymes dans les extraits :* l'acétokinase, la phospho-transacétylase, l'isocitratase, la malate-synthétase et toutes les enzymes du cycle ont été trouvées chez *A. aerogenes*.

Notre étude indique que le cycle tricarboxylique fonctionne comme voie oxydative lorsque l'organisme respire l'oxygène. En revanche, il n'intervient pas dans la respiration anaérobie du nitrate, probablement parce que, dans ces conditions, le nitrite qui s'accumule inactive à des degrés divers l'enzyme de condensation, l'aconitase, l'isocitrate-déshydrogénase, la cétoglutarate-déshydrogénase, la succinate-déshydrogénase et la fumarase.

Tout laisse supposer que, *in vivo* comme *in vitro*, les trois déshydrogénases du cycle sont couplées avec la nitrate-réductase par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs d'électrons.

Lorsque *A. aerogenes* se développe en aérobiose aux dépens du glucose, la glycolyse fonctionne plus vite que le cycle de Krebs, et il en résulte une accumulation importante d'acétate. Ce phénomène de régulation est dû, au moins en grande partie, à une répres-

sion catabolique de la biosynthèse des enzymes suivantes : enzyme de condensation, aconitase, isocitrate-déshydrogénase, cétoglutarate-déshydrogénase et succinate-déshydrogénase. Il confère à l'organisme le moyen d'utiliser comme source d'énergie la fermentation aérobie de préférence à la respiration de l'oxygène.

Quand la croissance se fait dans un milieu synthétique, la présence de l'oxygène ne semble pas indispensable à la biosynthèse des enzymes du cycle.

La formation de la fumarase est induite par son substrat et accrue par les conditions anaérobies de vie. En l'absence de $O_2$, le fumarate est simultanément réduit en succinate et hydraté en L-malate. *In vivo* s'établit ainsi une compétition entre la fumarate-réductase et la fumarase envers leur substrat commun, le fumarate.

## SUMMARY


### The tricarboxylic cycle in *Aerobacter aerogenes*.

By means of three different methods, the authors have demonstrated the existence of the tricarboxylic cycle in *A. aerogenes*. (1) *Technique of the sequential induction :* the cells adapted to one of the intermediary steps of the cycle are also adapted to several others. (2) *Action of fluoracetate :* fluoracetate inhibits $O_2$ respiration in presence of acetate, fumarate or succinate as electron donors ; inhibition is generally associated with an accumulation of citrate. (3) *Examination of extracts for the presence of enzymes :* acetokinase, phospho-transacetylase, isocitratase, malate-synthetase, and all enzymes of the cycle have been found in *A. aerogenes*.

The authors' findings show that the tricarboxylic cycle works as an oxidative pathway when the germ respires oxygen, but it does not play any part in anaerobic respiration of nitrate ; probably because, under these conditions, the nitrite which accumulates, more or less inactivates the condensation enzyme, aconitase, isocitrate-, cetoglutarate-, succinate-dehydrogenases and fumarase.

Everything suggests that *in vivo* as *in vitro,* the three dehydrogenases of the cycle are coupled with the nitrate-reductase by an electron carrier chain.

When *A. aerogenes* develops in aerobiosis at the expense of glucose, glycolysis works more rapidly than Krebs cycle, which results in an important accumulation of acetate. This regulation phenomenon is due to a catabolic repression of synthesis of the following enzymes : condensation enzyme, aconitase, isocitrate-, cetoglutarate- and succinate-dehydrogenases. It enables the microorganism to use aerobic fermentation instead of oxygen respiration as an energetic source.

When growth occurs in a synthetic medium, oxygen does not

seem to be indispensable for biosynthesis of the cycle enzymes.

Fumarase formation is induced by its substrate, and increases under anaerobic conditions. In the absence of $O_2$, fumarate is at the same time reduced into succinate and hydrated into L-malate. A competition takes therefore place *in vivo* between fumarate-reductase and fumarase for their common substrate : fumarate.

*Nota :* Le présent article recouvre en partie le travail de la thèse de doctorat d'Etat ès sciences physiques de M. Pierre Forget qui sera soutenue à la Faculté des Sciences de Marseille durant l'année 1967.

## BIBLIOGRAPHIE


[1] Anfinsen (C. B.). *Methods in enzymology,* Academic Press, New York, 1955, **1**, 695.
[2] Bernath (P.) and Singer (T. P.). *Methods in enzymology,* Academic Press, New York, 1962, **5**, 597.
[3] Bové (J.) et Raveux (R.). *Bull. Soc. Chim.,* 1957, **3**, 376.
[4] Collins (F. M.) and Lascelles (J.). *J. gen. Microbiol.,* 1962, **29**, 531.
[5] Dixon (G. H.) and Kornberg (H. L.). *Biochem. J.,* 1959, **72**, 3 P.
[6] Englesberg (E.) and Levy (J. B.). *J. Bact.,* 1955, **69**, 418.
[7] Forget (P.) et Pichinoty (F.). *Biochim. Biophys. Acta,* 1964, **82**, 441.
[8] Forget (P.) et Pichinoty (F.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1965, **108**, 364.
[9] Gilvarg (C.) and Davis (B. D.). *J. biol. Chem.,* 1956, **222**, 307.
[10] Goldman (D. S.). *J. Bact.,* 1956, **71**, 732.
[11] Goldman (D. S.). *J. Bact.,* 1956, **72**, 401.
[12] Gray (C. T.), Wimpenny (J. W. T.) and Mossman (M. R.). *Biochim. Biophys. Acta,* 1966, **117**, 33.
[13] Hadjipetrou (L. P.) and Stouthamer (A. H.). *J. gen. Microbiol.,* 1965, **38**, 29.
[14] Hager (L. P.) and Kornberg (H. L.). *Biochem. J.,* 1961, **78**, 194.
[15] Halpern (Y. S.), Even-Shoshan (A.) and Artman (M.). *Biochim. Biophys. Acta,* 1964, **93**, 228.
[16] Kennedy (I. R.) and Dilworth (M. J.). *Biochim. Biophys. Acta,* 1963, **67**, 226.
[17] Kluyver (A. J.). In *Symposium microbial metabolism,* Rome, 1953.
[18] Kornberg (H. L.) and Krebs (H. A.). *Nature,* 1957, **179**, 988.
[19] Kornberg (H. L.). *Biochem. J.,* 1966, **99**, 1.
[20] Korkes (S.). *Methods in enzymology,* Academic Press, New York, 1957, **3**, 435.
[21] Massey (V.). *Methods in enzymology,* Academic Press, New York, 1955, **1**, 729.
[22] Monod (J.). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes,* Thèse, Hermann, Paris, 1958.
[23] Morrison (J. F.) and Peters (R. A.). *Biochem. J.,* 1954, **58**, 473.
[24] Ochoa (S.). *Methods in enzymology,* Academic Press, New York, 1955, **1**, 685.

[25] Park (J. T.) and Johnson (M. J.). *J. biol. Chem.*, 1949, **181**, 149.
[26] Pascal (M.-C.) et Pichinoty (F.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **77**, 507.
[27] Peters (R. A.). *Proc. Roy. Soc.*, 1952, B **139**, 143.
[28] Peters (R. A.). In *Symposium sur le cycle tricarboxylique*, Paris, 1952.
[29] Pichinoty (F.) et Coudert (G.). *Experientia*, 1962, **18**, 257.
[30] Pichinoty (F.), Mottet (F.), Bigliardi-Rouvier (J.) et Forget (P.). *Z. Naturf.*, 1963, **18** *b*, 492.
[31] Pichinoty (F.). *C. R. Soc. Biol.*, 1964, **158**, 1122.
[32] Pichinoty (F.). In *Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microrganismes*, Colloque international du Centre National de la Recherche Scientifique, n° 124, Marseille, 1963, Editions du C.N.R.S., Paris, 1965, p. 523.
[33] Rider (B. F.) and Mellon (M. G.). *Ind. Eng. Chem.*, 1946, **18**, 96.
[34] Rose (I. A.), Grunberg-Manago (M.), Korey (S. R.) and Ochoa (S.). *J. biol. Chem.*, 1954, **211**, 737.
[35] Singer (T. P.) and Kearney (E. B.). *Methods of biochemical analysis*, Interscience Publishers, Inc., New York, 1957, **4**, 307.
[36] Stadtman (E. R.). *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1955, **1**, 596.
[37] Stanier (R. Y.). *J. Bact.*, 1947, **58**, 45.
[38] Stern (J. R.). *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1957, **3**, 425.
[39] Umbarger (H. E.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 140.
[40] Umbreit (W. W.), Burris (R. H.) and Stauffer (J. F.). *Manometric techniques*, Burgess Publishing Co, Minneapolis, 1957, 202.

Imprimé par l'Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette à Paris (France).
*Printed in France.* (71218)